

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年5月17日 (17.05.2001)

PCT

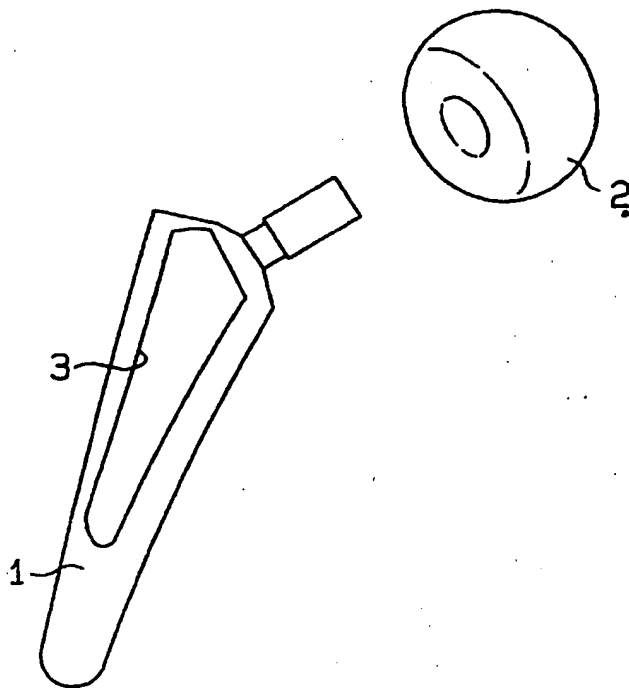
(10) 国際公開番号
WO 01/34218 A1

- (51) 国際特許分類⁷: A61L 27/00 (71) 出願人 および
(21) 国際出願番号: PCT/JP00/07892 (72) 発明者: 大串 始 (OHGUSHI, Hajime) [JP/JP]; 〒
634-0006 奈良県橿原市新賀町129番地の10 サントウ
(22) 国際出願日: 2000年11月9日 (09.11.2000) ル八木607号 Nara (JP).
(25) 国際出願の言語: 日本語 (74) 代理人: 恩田博宣 (ONDA, Hironori); 〒500-8731 岐阜
県岐阜市大宮町2丁目12番地の1 Gifu (JP).
(26) 国際公開の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
(30) 優先権データ: 特願平 11/320509 1999年11月11日 (11.11.1999) JP DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU,
LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL,
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式 PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ,
会社 ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
(JAPAN TISSUE ENGINEERING CO., LTD.) [JP/JP];
〒443-0022 愛知県蒲郡市三谷北通6丁目209番地の1
(Aichi (JP)). (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ユーロッパ特許

[続葉有]

(54) Title: TRANSPLANT MATERIAL AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME

(54) 発明の名称: 移植材料及びその製造方法



(57) Abstract: A transplant material which is capable of imparting desired mechanical properties, elevating bone tissue repair speed and improving biocompatibility. This transplant material comprises an artificial and biologically inactive material, which is to be implanted *in vivo* as a substitute for bone tissue, and at least one type of cells selected from among osteoblasts and precursory osteoblasts which are adhered to the surface of the artificial material so that the artificial material is coated with the bone matrix produced by the cells. The artificial material involves not only a biologically inactive material but also a biologically active substrate. This transplant material is produced by culturing mesenchymal stem cells collected from a living body to differentiate into at least one type of cells selected from among osteoblasts and precursory osteoblasts and then culturing the cells together with the artificial material to thereby adhere the differentiated cells on the surface of the artificial material and coat the surface of the artificial material with the bone matrix produced by the differentiated cells.

[続葉有]

WO 01/34218 A1



(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(57) 要約:

本発明は、所望とする機械的性質を付与できるとともに、骨組織修復速度及び生体親和性を向上させることができる移植材料及びその製造方法を提供する。

移植材料は、骨組織の代替として生体内に埋植するための非生体活性な人工材料の表面に、骨芽細胞及び前駆骨芽細胞から選ばれる少なくとも1種の細胞を付着させるとともに、その細胞が産生する骨マトリックスをコーティングさせたものである。人工材料は非生体活性材料のみならず、非生体活性な材料の表面に生体活性な基質を被覆したものも含む。移植材料は、生体から採取した間葉系幹細胞培養して、骨芽細胞及び前駆骨芽細胞から選ばれる少なくとも1種の細胞に分化させた後、人工材料とともに培養し、分化した細胞を人工材料の表面に付着させるとともに、分化した細胞が産生する骨マトリックスを人工材料の表面にコーティングさせることによって製造される。

明細書

移植材料及びその製造方法

技術分野

本発明は、例えば、ヒト、ペット、家畜等の外科的治療において、骨組織の代替として生体内に埋植されて使用される人工関節、人工骨、人工歯根等の移植材料及びその製造方法に関するものである。

従来の技術

この種の移植材料としては、例えば、ステム部分、骨頭部分及び臼蓋部分とから構成される人工関節が従来より知られている。前記人工関節のステム部分及び骨頭部分は、高い強度を保持できるとともに容易に腐食しない材料である、チタン合金又はアルミナセラミックス等の生体不活性な材料から構成されている。一方、前記臼蓋部分は、適当な弾力性を有する生体許容性材料である高密度ポリエチレンによって構成されている。そして、前記人工関節を、損傷を受けた股関節の代替として移植する場合、大腿骨の上部に穿設された中空部に、ポリメチルメタアクリレート（PMMA）骨セメントを介してステム部分を埋植するとともに、骨盤下部の寛骨に該骨セメントを介して臼蓋部分を埋植する。埋植された人工関節は、股関節の機能を十分に発揮することができるうえ、腐食を防止しつつ、高い強度を保持することができる。

一方、前記PMMA骨セメントは、メチルメタアクリレート単量体を重合させて硬化させる際に、非常に高い重合熱を発生することが知られている。そして、この重合熱によって骨セメントと接する骨組織に多大な損傷を与えるという問題が存在する。この問題を解決するために、前記人工関節のステム部分及び臼蓋部分を、骨セメントを用いずに直接骨組織と接するように埋植する手術を行った後、人工関節と骨組織とが十分に固定されるまで患者に安静状態を保持させて、その

患者自身の自然治癒力を利用して治療する治療法が行われていた。

前記治療法を行った場合、患者の骨髓に存在する間葉系幹細胞が人工関節と骨組織との隙間まで移動して着床し、さらに骨修復活性の高い骨芽細胞へと増殖及び分化する。そして、前記骨芽細胞が骨マトリックスを産生し、産生された骨マトリックスが前記人工関節及び骨組織の表面にコーティングされることにより前記隙間が埋められ、人工関節が固定される。

また、特開平3-45267号公報には、骨芽細胞及び／又は前駆骨芽細胞を含む動物から採取された体液と、リン酸カルシウム化合物とから構成された骨欠損部及び骨空隙部充てん剤が開示されている。該骨欠損部及び骨空隙部充てん剤は、多孔体状又は顆粒状に成形されたリン酸カルシウム化合物に、治療対象である動物自身から採取した体液を吸着させ、必要に応じて人工的に培養することによって調製される。調製された骨欠損部及び骨空隙部充てん剤を、前記動物の骨組織の欠損部又は空隙部に充てんする。該充てん剤は、生体適合性に優れ、異物反応、炎症反応等も起こらず、しかも充てん箇所からの充てん剤の漏出も極めて少ないため、速やかな新生骨の形成を期待することができる。

ところが、前記従来的人工関節では、人工関節と骨組織とを接着するためのPMMA骨セメントが、重合時に発熱したり残留モノマーを溶出させたりすることによって、周囲の骨組織を含む生体組織を害するおそれがあった。従って、該人工関節を機械的（物理学的）に非常に過酷な条件下で使用する場合、ステム部分又は臼蓋部分と、それを取り囲む骨組織との界面が破壊されたり、さらには人工関節がゆるんだり脱落したりして不具合が発生する可能性が著しく高かった。

また、前記従来 of 自然治癒力を利用した治療法では、間葉系幹細胞が人工関節及び骨組織の表面に移動して骨マトリックスを産生するまでには、非常に長い時間を要した。特に、高齢な生物体では、体内に存在する間葉系幹細胞の数が少ないために、骨芽細胞及び前駆骨芽細胞による骨修復速度が著しく遅く、完治するまでに非常に長い時間を要していた。

一方、前記従来 of 骨欠損部及び骨空隙部充てん剤では、その基質として、リン

酸カルシウムセラミックスの多孔体や顆粒等が使用されていた。これらの基質から構成されるセラミックスの機械的強度は低く、また、典型的な脆性材料であるため、大きな荷重のかかる部位や弾性変形が要求されるような部位には利用できなかった。

発明の概要

本発明は、上記従来技術の問題点を解決するためになされたものであり、所望の機械的性質を付与することができるとともに、骨組織修復速度及び生体親和性を向上させることができる移植材料及びその製造方法を提供することにある。

上記の目的を達成するために、本発明の第1の態様は、骨組織の代替として生体内に埋植するための非生体活性な人工材料に、骨芽細胞及び前駆骨芽細胞から選ばれる少なくとも1種の細胞を付着させるとともに、前記細胞が産生する骨マトリックスをコーティングさせた移植材料である。

本発明の別の態様は、前記人工材料が、チタン、チタン合金、ステンレス鋼、コバルトクロム合金、コバルトクロム-モリブデン合金、アルミナセラミックス、カーボンセラミックス、ジルコニアセラミックス、炭化珪素セラミックス、窒化ケイ素セラミックス、ガラスセラミックス、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリウレタン、ポリビニルアルコール、ポリプロピレン、ポリカーボネート、ポリメタクリル酸メチル、メタクリル酸エステル系ポリマー、シリコーン樹脂及び生体吸収性高分子から選ばれる少なくとも1種の材料から構成された移植材料である。

本発明の更に別の態様は、前記人工材料の表面に生体活性な基質を被覆した移植材料である。

本発明の更に別の態様は、前記生体活性な基質が、ヒドロキシアパタイト、リン酸三カルシウム、カルシウム欠損型アパタイト、非晶質リン酸カルシウム、リン酸四カルシウム、リン酸八カルシウム、フッ素アパタイト、炭酸アパタイト、ピロリン酸カルシウム、ブルッシャイト、モネタイト、炭酸カルシウム、アパタ

イト含有結晶化ガラス、メタリン酸カルシウム含有結晶化ガラス及びバイオガラスから選ばれる少なくとも1種を含む移植材料である。

前記人工材料は、チタン、チタン合金、ステンレス鋼、コバルトクロム合金及びコバルトクロム－モリブデン合金から選ばれる少なくとも1種の金属材料によって構成されてもよい。

また、前記人工材料は、アルミナセラミックス、カーボンセラミックス、ジルコニアセラミックス、炭化珪素セラミックス、窒化ケイ素セラミックス及びガラスセラミックスから選ばれる少なくとも1種のセラミックス材料によって構成されてもよい。

また、前記人工材料は、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリウレタン、ポリビニルアルコール、ポリプロピレン、ポリカーボネート、ポリメタクリル酸メチル、メタクリル酸エステル系ポリマー、シリコーン樹脂及び生体吸収性高分子から選ばれる少なくとも1種の合成樹脂材料によって構成されてもよい。

前記骨マトリックス中に、骨髓細胞、間葉系幹細胞、骨芽細胞及び前駆骨芽細胞から選ばれる少なくとも1種の細胞が分泌する成長因子が含有されてもよい。また、前記人工材料の表面は、多孔質状に形成されてもよい。さらに、前記骨マトリックスの少なくとも一部は石灰化させてもよい。前記骨芽細胞又は前駆骨芽細胞は、前記生体由来の間葉系幹細胞を培養して分化させたものでもよい。

また、本発明の更に別の態様は前記移植材料の製造方法である。該方法では、生体から採取した間葉系幹細胞を培養して骨芽細胞及び前駆骨芽細胞から選ばれる少なくとも1種の細胞に分化させる工程と、分化した細胞を非生体活性な人工材料とともに培養する工程とを含み、それにより、前記分化した細胞が人工材料の表面に付着されるとともに、前記分化された細胞が産生する骨マトリックスが人工材料の表面にコーティングされる。

前記方法は、分化させた細胞を継代培養して細胞数を増やす工程を更に含んでいてもよい。

本発明の更に別の製造方法は、生体から採取した間葉系幹細胞を非生体活性な人工材料とともに培養する工程と、前記間葉系幹細胞を人工材料の表面に付着させるとともに、表面に付着された間葉系幹細胞を骨芽細胞及び前駆骨芽細胞から選ばれる少なくとも1種の細胞に分化させる工程とを含み、それにより前記分化された細胞が産生する骨マトリックスが人工材料の表面にコーティングされる。

図面の簡単な説明

図1は、本発明の移植材料に使用される人工材料の一つである、ステムと人工骨頭からなる人工関節を示す概略図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施形態を詳細に説明する。

骨組織は、骨マトリックスと骨芽細胞及び前駆骨芽細胞が分化した骨細胞等から構成され、該骨細胞は骨マトリックス中に散在する骨小孔内に定着している。前記骨マトリックスは、比較的少量のコンドロイチン硫酸を主体とするムコ多糖タンパク質（プロテオグリカン）と、多量のリン酸カルシウム、リン酸マグネシウム、炭酸カルシウム等から構成されており、骨形成因子（BMP）等の種々の成長因子類を含んでいる。さらに、骨マトリックスは通常かなりの量の膠原繊維を含んでおり、その膠原繊維によってある程度の弾力性が付与される。同時に、骨芽細胞等の働きによってアパタイト等の無機成分が形成され（骨マトリックスの石灰化）、骨に硬さが付与される。

骨組織の形成時及びリモデリング時では、骨マトリックスの周縁に存在する骨芽細胞、前駆骨芽細胞及び破骨細胞がそれぞれ機能する。前記骨芽細胞及び前駆骨芽細胞は間葉系幹細胞（Mesenchymal Stem Cells）が分化することによって生成される。該間葉系幹細胞は骨髓中に存在しており、非常に旺盛な分化能を有している。また、ステロイドホルモンの1種であるデキサメサゾン、前記間葉系幹細胞をインビトロ（in vitro）で骨芽細胞及び前駆骨芽細胞へと分化させるこ

とに關与している。

本發明の移植材料は、骨組織の代替として生体内に埋植するための非生体活性な人工材料の表面に、骨芽細胞及び前駆骨芽細胞から選ばれる少なくとも1種の細胞を付着させるとともに、その細胞が產生する骨マトリックスをコーティングさせたものである。前記移植材料は、ヒト、ペット、家畜等の骨組織が損傷された場合に、その組織の代替として生体内に埋植され、使用される。

本明細書において、埋植とは人為的に製造されたものを生体内に外科的に移植して埋入することを意味する。

前記人工材料は、骨組織の代替として種々の形状で利用することができる。例えば、股関節、膝関節、指関節、肩関節、肘関節、足関節等の人工関節、金属製人工骨、合成樹脂製人工骨、セラミックス製人工骨、骨組織同士を連結させるためのボルト（スクリュー）、補綴材、歯科用インプラント材、骨接合用品等が挙げられる。

前記人工材料は、生体内で劣化したり、分解したり、或いは分解されて生体に悪影響を及ぼしたりすることのない非生体活性な材料によって構成されている。非生体活性な材料は、骨組織の代替として生体内に埋植された場合、被膜（異物膜）等が介在せずに骨組織と直接結合することができる生体活性な材料を除く材料からなり、生体許容性材料及び生体不活性材料を含む。

前記生体許容性材料は、生体内に埋植された場合、骨組織との間に結合組織性の厚い被膜（異物膜）が形成されて生体組織と隔絶される材料である。例えば、高密度ポリエチレンやステンレス鋼等が挙げられる。また、生体不活性材料とは、生体内に埋植された場合、骨組織との間に薄い被膜（異物膜）が介在され、好条件下では一部骨組織と直接接することができる材料である。例えば、アルミナセラミックス、カーボンセラミックス、ジルコニアセラミックス、チタン合金等が挙げられる。

さらに、人工材料は、間葉系幹細胞、骨芽細胞及び前駆骨芽細胞が接着して増殖することができるとともに、それらの細胞が產生する骨マトリックスを該材料

上にコーティングできる材料から構成されていることが好ましい。このような材料としては、例えば、チタン、チタン合金、ステンレス鋼、コバルトクロム合金、コバルトクロム－モリブデン合金、アルミナセラミックス、カーボンセラミックス、ジルコニアセラミックス、炭化珪素セラミックス、窒化ケイ素セラミックス、ガラスセラミックス、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリウレタン、ポリビニルアルコール、ポリプロピレン、ポリカーボネート、ポリメタクリル酸メチル、メタクリル酸エステル系ポリマー、シリコーン樹脂及び生体吸収性高分子から選ばれる少なくとも1種の材料が挙げられる。

さらに、高い強度が要求される骨組織の代替に用いる場合には、チタン、チタン合金、ステンレス鋼、コバルトクロム合金、コバルトクロム－モリブデン合金等の金属材料、又はアルミナセラミックス、カーボンセラミックス、ジルコニアセラミックス、炭化珪素セラミックス、窒化ケイ素セラミックス、ガラスセラミックス等のセラミックス材料を好適に使用することができる。

また、柔軟性が要求される骨組織の代替に用いる場合には、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリウレタン、ポリビニルアルコール、ポリプロピレン、ポリカーボネート、ポリメタクリル酸メチル、メタクリル酸エステル系ポリマー、シリコーン樹脂、生体吸収性高分子等の弾性変形可能な合成樹脂材料を好適に使用することができる。

人工材料の表面は多孔質であることが好ましい。なぜならば、間葉系幹細胞、骨芽細胞、前駆骨芽細胞がその孔内に容易に入り込むことができ、かつ、それらの細胞がより安定な状態で定着することができるからである。

また、前記非生体活性な人工材料の表面は、生体活性な基質で被覆されていると好ましい。それにより、骨芽細胞や前駆骨芽細胞の定着及び骨マトリックスの産生をより一層促進させることができるうえ、生体親和性をさらに向上させることができる。このような生体活性な基質としては、例えば、ヒドロキシアパタイト、リン酸三カルシウム、カルシウム欠損型アパタイト、非晶質リン酸カルシウム、リン酸四カルシウム、リン酸八カルシウム、フッ素アパタイト、炭酸アパタ

イト、ピロリン酸カルシウム、モネタイト、ブルッシャイト等のリン酸カルシウム類、炭酸カルシウム類、生体内でリン酸カルシウム類を吸着することができる化合物、アパタイト含有結晶化ガラス、メタリン酸カルシウム含有結晶化ガラス、バイオガラス等の生体活性ガラスによって代表される生体内で材料表面にアパタイト層を形成することができる化合物、さらに、擬似体液浸漬法によってアパタイト層を形成させることができるチタン、チタン合金、高分子材料等が挙げられる。

前記骨芽細胞又は前駆骨芽細胞は、移植材料を埋植する予定の生体から採取した骨髓細胞から分離・培養によって増殖された間葉系幹細胞を、分化誘導因子（デキサメサゾン）を含有する培養液中で培養することによって分化させたものであることが好ましい。それにより、移植後の自己免疫によって拒絶反応が引き起こされる等の不具合を確実に防止することができる。

骨マトリックスは、移植後の生体親和性をより一層向上させるために、人工材料の表面に厚くコーティングされていることが好ましい。コーティングされた骨マトリックスの一部が石灰化されていることが更に好ましい。さらに、この骨マトリックス中に、骨髓細胞、間葉系幹細胞、骨芽細胞及び前駆骨芽細胞から選ばれる少なくとも1種の細胞が分泌する骨形成因子等の成長因子が含有されていることが好ましい。前記成長因子は、移植された生体内の間葉系幹細胞の生理的な着床、増殖及び分化を促進させることができるので、骨組織修復速度及び生体親和性をより一層向上させることができる。

次に、上記移植材料の作用について説明する。

上記のように構成される移植材料を製造する際には、まず、骨組織の代替として所定形状をなす人工材料を用意する。さらに、必要に応じて、プラズマ溶射法、擬似体液浸漬法、交互浸漬法等を用いて、前記人工材料の表面にヒドロキシアパタイト等の生体活性な基質を被覆する。続いて、前記材料を滅菌する。次に、注射器等を用いて、移植予定の生体から骨髓細胞を無菌的に採取する。このとき、この骨髓細胞から間葉系幹細胞を公知の方法により分離・培養、さらに継代培養

によって増殖させるとよい。

続いて、前記骨髄細胞又は間葉系幹細胞を人工材料に付着させ、デキサメサゾン、 β -グリセロリン酸ナトリウム、アスコルビン酸等を含有する培養液中で培養して骨芽細胞及び前駆骨芽細胞へと分化させ、それらの細胞が産生する骨マトリックスを人工材料の表面にコーティングさせる。或いは、前記骨髄細胞又は間葉系幹細胞を前記培養液中で予め骨芽細胞及び前駆骨芽細胞へと分化させた後に、滅菌した人工材料とともに培養することによって、それらの細胞を人工材料の表面に付着させるとともに、それらの細胞が産生する骨マトリックスを人工材料の表面にコーティングさせてもよい。

前記骨髄細胞又は間葉系幹細胞を人工材料とともに培養しながら分化させる場合、まず、骨髄細胞又は間葉系幹細胞を含む細胞浮遊液を調製し、これに人工材料を浸漬する。すると、前記細胞は前記培養液に浸漬された人工材料の表面に付着する。その後、この培養液中で培養すると、人工材料の表面で増殖しながら骨芽細胞及び前駆骨芽細胞へと分化する。分化した骨芽細胞及び前駆骨芽細胞は細胞外に骨マトリックスを産生し、該骨マトリックスは、異物膜等を介在することなく人工材料の表面に直接コーティングされる。

一方、骨髄細胞又は間葉系幹細胞を予め骨芽細胞及び前駆骨芽細胞に分化させた後に人工材料とともに培養する場合、まず、骨髄細胞又は間葉系幹細胞を前記培養液を満たした培養皿内で培養する。該細胞は非常に増殖能が高いため、培養皿の底面に接着しながら迅速に増殖する。その後、該細胞を前記培養液中で培養すると、多数の前駆骨芽細胞及び骨芽細胞へと分化する。このとき、必要に応じて継代培養することによって細胞数をさらに増やしてもよい。骨芽細胞及び前駆骨芽細胞数が十分に増えたところで、トリプシン溶液等を用いてそれらの細胞を培養皿の底面から剥離させた後、前記培養液中に浮遊させて細胞浮遊液を調製する。続いて、細胞浮遊液中に前記人工材料を浸漬させてインキュベータ内で培養する。このとき、骨芽細胞及び前駆骨芽細胞の一部は、培養液に浸漬された人工材料の表面に接着し、その表面上で生育する。そして、該細胞は骨マトリックス

を産生し、産生された骨マトリックスは異物膜等を介在することなく人工材料の表面に直接コーティングされる。

さて、上記のように構成された移植材料を骨組織の代替として生体内に埋植した場合、移植材料の表面は、生体自身の細胞と骨マトリックスとによってコーティングされていることから、隣接する骨組織及びその他の組織や細胞に対して非常に高い生体親和性を有することとなる。また、骨マトリックスが移植材料の表面全体にコーティングされていることから、生体が移植材料を異物と認識することがなく、炎症反応の発生や被膜（異物膜）の形成等の生体反応が回避される。

さらに、予め移植材料の表面に付着された骨芽細胞及び前駆骨芽細胞は、移植の時点で既に骨修復活性が非常に高められた状態になっており、移植後直ちに移植材料の周囲に骨マトリックスをコーティングしながら骨新生を開始する。そして、時間の経過とともに、これらの細胞は移植材料と周囲の骨組織との隙間を緻密に埋めて骨修復し、移植材料をより一層確実に固定化する。

また、移植材料表面の骨マトリックスが生体の自然発生的な間葉系幹細胞、骨芽細胞及び前駆骨芽細胞の生理的な着床及び生育を促進するので、移植後しばらく経過すると、それらの細胞が移植材料の表面に生理的に着床する。そして、これらの細胞は、前記移植材料の骨マトリックス上で新たな骨マトリックスを産生しながら骨修復を開始し、移植材料をさらに確実に固定化する。

さらにまた、時間が経過すると、前記人工材料を取り囲むように修復された骨組織は、破骨細胞、前駆骨芽細胞及び骨芽細胞の働きによる生体の生理的な代謝作用によって、常に適正に更新される状態を継続的に維持するようになる。このような状態になれば、移植材料は長期間の使用によってもゆるみや脱落等がほとんど起こらない。

上記実施形態によって発揮される効果について、以下に記載する。

本実施形態の移植材料は、骨組織の代替として生体内に埋植するための非生体活性な人工材料の表面に、骨芽細胞及び前駆骨芽細胞から選ばれる少なくとも1種の細胞を付着させるとともに、付着した細胞が産生する骨マトリックスをコー

ティングさせたものである。このため、人工材料を構成する非生体活性材料を選択することによって、移植材料に対して所望とする機械的性質（機械的強度や耐摩耗性等）を容易かつ確実に付与させることができる。即ち、高い機械的強度を有する骨組織や弾性変形可能な骨組織の代替など、広範囲にわたる使用目的に応じて、移植材料を選択することができる。

さらに、骨修復活性の高い細胞が移植材料の表面に付着されていることから、生体内に移植された直後から、該細胞が移植材料と周囲の骨組織との隙間を埋めるように作用し、骨組織修復速度をより一層高めることができる。また、高齢の生物体においては、生体内の自然発生的な骨修復速度が遅い場合が多い。そのような場合でも、人為的に骨修復活性を高めた細胞を付着させることによって、移植材料の早期治療及び早期固定を確実に行うことができる。従って、完治するまでに要する日数を少なくすることができ、身体的、精神的負担を強く感じる期間を短縮させることができるとともに、治療にかかる費用を抑制することが可能である。

加えて、骨芽細胞及び前駆骨芽細胞が産生した骨マトリックスが移植材料の表面にコーティングされているので、移植材料の表面と骨組織との間に被膜（異物膜）が形成されず、生体親和性を向上させることができる。従って、移植直後から長期間に渡って、移植された生体内での生体親和性を非常に高い状態で維持することができる。また、生体内の自然発生的な間葉系幹細胞、骨芽細胞及び前駆骨芽細胞の生理的な着床及び生育を促進させることもできる。

以上に述べたように、本発明によれば、移植材料による骨組織の早期治療及び早期固定を容易かつ確実に行うことができるうえ、移植材料を長期間に渡ってほとんど不具合なく使用することができる。

一方、従来的人工関節では、非生体活性材料であるPMMA骨セメント又は人工材料が直接骨組織と接するように構成されていたので、それらの表面に被膜が形成され、人工関節がゆるんだり脱落したりして不具合が発生する可能性が著しく高かった。これに対し、本実施形態の移植材料では、その表面にコーティング

された骨マトリックスが生体親和性を大幅に高めている。その結果、人工関節のゆるみや脱落がほとんど起こらず、長期間に渡って不具合なく使用することができる。

さらに、前記PMMA骨セメントは硬化する際に高い重合熱を発生するので、骨セメントと接する骨組織に多大な損傷を与えていた。その結果、骨セメントと周囲の骨組織との生体親和性を大幅に低下させ、生体に対する負担を著しく増大させていた。これに対し、本実施形態の移植材料では、骨修復活性が非常に高められた移植材料を使用していることから、骨セメントを使用しなくても自然治癒力を利用して、移植材料の固定化を迅速に行わせることができる。従って、前記重合熱の問題を容易かつ確実に解決することができる。また、PMMA骨セメントを重合させる際の残留モノマーによる為害作用の問題も確実に解決することができる。

また、従来の人工関節等の移植材料では、治療において高価な薬剤であるサイトカイン等の生物学的因子を投与することによって、骨修復活性を高めることが検討されている。しかしながら、本実施形態の移植材料では、既に骨修復活性が高められた骨芽細胞及び前駆骨芽細胞が付着されており、前記生物学的因子の投与の必要がほとんどないことから非常に経済的である。また、術後のアフターケアの負担を軽減させることもできる。

また、従来より、移植予定の生体から腸骨等の骨組織を採取し、損傷された骨組織の代替としてその生体内に埋植して使用する自家骨移植手術が行われていた。しかしながら、この自家骨移植手術では、損傷された組織以外の骨組織を採取するために余分な手術を行う必要があった。これに対し、本実施形態の移植材料では、注射器等を用いて骨髓細胞を採取するという非常に負担の少ない手術を行うのみにとどまり、前記余分な手術の必要が全くないため、移植される生体に対して身体的、精神的負担を著しく軽減させることができる。

さらに、この移植材料の骨マトリックス中には、骨髓細胞、間葉系幹細胞、骨芽細胞及び前駆骨芽細胞から選ばれる少なくとも1種の細胞が分泌する成長因子

等の生物学的因子を含むこともできる。それにより、移植された生体内の間葉系幹細胞の生理的な着床及び増殖、並びに骨芽細胞、前駆骨芽細胞への分化を促進させることができる。また、仮に、何らかの原因により移植材料表面に付着された細胞が死滅した場合でも、骨マトリックスやマトリックスに含まれている前記生物学的因子が生体内の間葉系幹細胞の生理的な着床等を促進させることができる。従って、骨組織修復速度及び生体親和性をより一層向上させることができる。

人工材料は、チタン、チタン合金、ステンレス鋼、コバルトクロム合金、コバルトクロム-モリブデン合金、アルミナセラミックス、カーボンセラミックス、ジルコニアセラミックス、炭化珪素セラミックス、窒化ケイ素セラミックス、ガラスセラミックス、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリウレタン、ポリビニルアルコール、ポリプロピレン、ポリカーボネート、ポリメタクリル酸メチル、メタクリル酸エステル系ポリマー、シリコーン樹脂及び生体吸収性高分子から選ばれる少なくとも1種の材料から構成することができる。それにより、該移植材料が生体内で劣化したり、分解したり、或いは分解されて生体に悪影響を及ぼしたりせずに、損傷を受けた骨組織の代替としての機能を確実に発揮させることができる。

さらに、多種の材料から治療に最も適した材料を適宜選択して使用することができるので、所望とする機械的性質が付与された移植材料が得られる。特に、金属材料やセラミックス材料から構成された人工材料は、非常に高い機械的強度を備えていることから、高い強度が要求される骨組織の代替に適している。また、セラミックス材料によって構成された人工材料は、その表面を容易に多孔質状に形成させることができるうえ、該材料を軽量化することができる。また、弾性変形可能な合成樹脂材料によって構成された人工材料は、柔軟性を要求される骨組織の代替に適している。

非生体活性な人工材料は、その表面に生体活性な基質を被覆することによって、間葉系幹細胞、骨芽細胞及び前駆骨芽細胞の付着、生育及び骨修復をより一層促進させることができる。

移植材料に付着されるべき骨芽細胞及び前駆骨芽細胞として、移植予定の生体由来の間葉系幹細胞を培養して分化させたものを使用することによって、移植された生体の自己免疫による拒絶反応を確実に防止することができる。

また、例えば、高齢の生物体から採取した間葉系幹細胞であっても、インビトロで培養して増殖させることができる。それにより、若齢の生物体由来の間葉系幹細胞とほぼ同様に増殖及び分化させることができるとともに、ほぼ同様の骨修復活性を発揮させることができる。従って、高齢の生物体に対しても非常に高い治療効果を発揮することができる。

人工材料の表面を多孔質にすることによって、間葉系幹細胞、骨芽細胞及び前駆骨芽細胞が人工材料に容易に入り込むことができ、それらの細胞を安定な状態で定着させることができる。さらに、人工材料の表面積が大きくなることから、より多くの細胞を定着させることができるとともに、骨修復された後には周囲の骨組織に対して広い面積で、かつ複雑に入り組んだ形状で接することができることから、移植材料のゆるみや脱落を起し難くすることができる。

骨マトリックスを石灰化させることによって、移植部位の周囲の骨組織に対して移植材料を非常に強固に結合させることができる。それにより、生体親和性をより一層向上させることができるうえ、完治するまでの期間を著しく短縮させることができる。

本実施形態の移植材料の製造方法では、生体から採取した間葉系幹細胞を培養して骨芽細胞及び前駆骨芽細胞から選ばれる少なくとも1種の細胞に分化させる工程と、分化させた細胞を非生体活性な人工材料とともに培養する工程とを含む。それにより、分化した細胞が人工材料の表面に付着されるとともに、分化した細胞が産生する骨マトリックスが人工材料の表面にコーティングされる。前記方法を用いれば、所望とする機械的性質を付与できるとともに、骨組織修復速度及び生体親和性を向上させることができる移植材料を容易に製造することができる。

実施例

以下、上記実施形態を具体化した実施例及び比較例について説明する。

(皮下移植試験)

(実施例1)

7週齢雄 Fischer 系ラットの大腿骨骨幹部より骨髓細胞を採取し、該細胞に、15%ウシ胎児血清(FBS)を含有する α -MEM(最小必須培養液)を加え、インキュベータ(37℃、5%CO₂)内で7~12日間初期培養した。

初期培養後、0.01%トリプシン溶液で該骨髓細胞を処理することによって、 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ cells/mlの細胞浮遊液を調製した。この浮遊液に円盤状(直径3.4mm、厚さ2mm)の人工材料(チタン合金、ステンレス鋼、アルミナセラミックス及び高密度高分子ポリエチレン)を添加し、インキュベータ(37℃、5%CO₂)内で約2時間浸漬した。また、この細胞浮遊液に、直方体状(3×3×5mm)に形成するとともに多孔質状に形成した人工材料(チタン合金、ステンレス鋼、アルミナセラミックス及び高密度高分子ポリエチレン)を添加し、前記と同様にインキュベータ内で約2時間浸漬した。

その後、これらの材料を、上記培地に抗生物質、 10^{-8} Mデキサメサゾン、10mM β -グリセロリン酸ナトリウム及び50 μ g/mlアスコルビン酸を含むように調製した培地2mlを加えた35mm培養皿に移し替え、インキュベータ(37℃、5%CO₂)内で約1週間培養した。なお、必要に応じて培地交換した。

これらの移植材料の表面には、骨髓由来の間葉系幹細胞から分化した前駆骨芽細胞及び骨芽細胞が付着されるとともに、それらの細胞が産生する骨マトリックスがコーティングされていることが、アルカリフォスファターゼ活性及びアリザリンレッド染色により確認された。さらに、前記多孔質状に形成された移植材料を同系ラットの背部皮下に移植する移植試験を行った結果、約1~2週間後には移植材料表面に骨組織の新生が確認された。

(比較例 1)

4種類の人工材料(チタン合金、ステンレス鋼、アルミナセラミックス及び高密度高分子ポリエチレン)をそのままラットの背部皮下に移植する移植試験を行った。その結果、皮下への移植後の早い段階で人工材料の周囲に繊維性組織(異物膜)の介在が確認され、骨組織の新生は全く確認されなかった。

(人工関節使用試験)

(実施例 2)

成犬から骨髓細胞を採取し、その細胞を実施例 1 と同様に 7 ～ 12 日間初期培養した後に細胞浮遊液を調製した。この浮遊液中にチタン合金から構成された人工股関節のステム部分を浸漬し、インキュベータ(37℃、5%CO₂)内で約 2 時間浸漬した。その後、実施例 1 と同様の培地を加えた培養容器にステム部分を移し替え、インキュベータ(37℃、5%CO₂)内で約 1 週間培養した。なお、必要に応じて培地交換した。

この人工股関節のステム部分の表面には、骨髓由来の間葉系幹細胞から分化した前駆骨芽細胞及び骨芽細胞が付着されるとともに、それらの細胞が産生する骨マトリックスがコーティングされていることが確認された。さらに、この人工股関節のステム部分を前記成犬の大腿骨の空隙部に埋植したところ、ステム部分と大腿骨との結合が認められた。さらに、この人工股関節は、移植後の早い時期にステム部分の表面に骨組織の新生が確認されるとともに、ステム部分の固定も早期に完了した。

(比較例 2)

前記細胞浮遊液中に浸漬していない人工股関節を用いて、上記実施例 2 と同様に人工股関節を移植したところ、ステム部分と大腿骨との結合が部分的にしか認められず、結果としてステム部分のゆるみを生じた。

(実施例 3)

体重12kgのビーグル犬の上腕骨より骨髓細胞2mlを採取した。この骨髓細胞を、ヘパリンが添加されたFBS2mlを加えたチューブに移し、遠心分離(900rpm, 10分, 24℃)を行った。遠心分離されたチューブ内から脂肪細胞と上澄み液を取り除いた後、T-75フラスコに移し、15%FBS及び抗生剤を含む培地で10日間初代培養を行った。培地は1週間に3回交換した。

本実施例では、図1に示すチタン(以下、「Ti」と記載)合金からなるステム1と、高純度アルミナからなる人工骨頭2を使用した。ステム1の両面にはくぼみ面3(深さ0.5mm, 面積1.3cm²)を設け、純Tiの溶射処理を施した。溶射面の平均表面粗さは32μmであった。初代培養後、0.25%トリプシンで剥離処理した後、細胞浮遊液を作製した。

直径9.4mmの培養用ディッシュにイヌ用ステムを置き、ステム上側の純Ti溶射処理面(面積1.3cm²)に 1×10^5 cellsの細胞浮遊液を乗せ、37℃、30分間インキュベートして細胞をTi溶射処理面に接着させた。続いて、10mMβ-グリセロフォスフェート(β-glycerophosphate)、82μg/mlビタミンCフォスフェート(vitamin C phosphate)及び 10^{-8} Mデキサメサゾン(Dexamethasone)を添加した培地を48ml加えて11日間継代培養を行った。

このように継代培養を行ったステムにアルカリフوسفアターゼ染色を行ったところ、細胞を播種した側のTi溶射処理面は赤く染色されていた。一方、細胞を播種していないステムの裏側のTi溶射処理面は染色されなかった。このことは細胞を播種した面には骨芽細胞に分化した細胞が一面に存在していることを意味する。

ビーグル犬の右側大腿骨の大転子から小転子にかけてのラインより骨頭側を切り、骨頭部分を摘出し、髓腔拡大、トライアルでラスピングを行った。上述のように調製した片面に細胞を搭載したステムの表面をPBS(-)及び生理食塩水でよく洗浄し、大腿骨髓腔に挿入した後、人工骨頭を装着した。

術後3週で屠殺し、ステム埋入部分を摘出した。ステムのTi溶射処理部分を組織学的に観察した結果、細胞を搭載したTi溶射面では、新生骨がTi溶射面

の凹部にまで形成されており、細胞搭載面のほぼ全面が新生骨で覆われていた。一方、細胞を搭載していないステムのTi溶射面では部分的にしか骨との接触が観られなかった。

なお、本実施形態は、次のように変更して具体化することも可能である。

金属材料又はセラミックス材料と、合成樹脂材料とを組み合わせる人工材料を構成することもできる。例えば、ステム部分、骨頭部分及び臼蓋部分からなる人工関節において、ステム部分及び骨頭部分を金属材料又はセラミックス材料から構成するとともに、臼蓋部分を合成樹脂材料から構成することもできる。このような構成とした場合、各部分毎に要求される機械的性質により適合した移植材料となるので、生体に対する違和感をより一層低減させることができる。

移植材料は、非生体活性な材料からなる人工材料の表面に、生体活性な基質が被覆されていなくてもよい。このような構成にしても、間葉系幹細胞、骨芽細胞及び前駆骨芽細胞を人工材料の表面に付着させることができるうえ、骨芽細胞及び前駆骨芽細胞が産生する骨マトリックスをコーティングさせることができる。

人工材料の表面を多孔質状に形成せずに、平坦に形成してもよい。このような構成を備えた人工材料では、該人工材料の成形を容易に行うことができる。

間葉系幹細胞、骨芽細胞及び前駆骨芽細胞が接着して増殖することができない非生体活性な材料により人工材料を構成し、その人工材料の表面に生体活性な基質を被覆したものを使用して移植材料を構成してもよい。このように構成した場合でも、移植材料の表面に骨芽細胞及び前駆骨芽細胞から選ばれる少なくとも1種の細胞を付着させることができるうえ、骨マトリックスをコーティングさせることができる。

移植材料の表面に付着される骨芽細胞又は前駆骨芽細胞として、主要組織適合性遺伝子複合体(MHC)又はヒト白血球抗原(HLA)が一致する同種の生物体由来の細胞を使用してもよい。或いは、前記MHC又はHLA(抗原性)が一致しない細胞を使用するとともに、免疫抑制剤を投与してもよい。このように構成した場合、移植材料を移植したときに、自己免疫による拒絶反応を確実に抑制

することができる。また、例えば、移植予定の生体の骨髄細胞がガン化している可能性があるような場合には、その骨髄細胞由来の細胞が付着された移植材料を生体に移植することによって、ガンの増殖及び転移を促進させてしまうおそれがある。しかしながら、ガン化のおそれのない健康な生物体由来の骨髄細胞を使用することによって、それらの可能性をなくすことができる。また、臍帯血が利用できる場合には、その中に含まれる間葉系幹細胞を使用すれば大変有利である。

骨髄細胞又は間葉系幹細胞の一部を人工材料とともに培養液中で培養するとともに、残りを培養皿上で培養し、細胞数が増えたところで培養皿上の細胞を前記人工材料の表面に付着させて培養してもよい。さらに、継代培養して増えた細胞の一部を前記人工材料の表面に付着させて培養するとともに、残りの細胞をさらに継代培養し、細胞数が増えたところで前記人工材料の表面に付着させて培養してもよい。このように構成した場合、骨芽細胞及び前駆骨芽細胞数を短時間で効率的に増やすことができ、移植材料の製造に要する期間を大幅に短縮することができる。また、より多くの細胞を移植材料の表面に付着させることもできる。

骨欠損部又は骨空隙部に対応する形状に成形された人工材料を用いて移植材料を製造し、その移植材料を骨欠損部又は骨空隙部に埋植して治療してもよい。このように構成した場合、所望とする機械的性質を付与することができるとともに、骨組織修復速度及び生体親和性を向上させることができる。

間葉系幹細胞を骨芽細胞及び前駆骨芽細胞に分化させるための分化誘導因子として、骨形成タンパク質、繊維芽細胞増殖因子、グルコルチコイド又はプロスタグランジンを使用してもよい。

移植材料の表面に、デキサメサゾン、骨形成タンパク質、繊維芽細胞増殖因子、グルコルチコイド及びプロスタグランジンから選ばれる少なくとも1種の成長因子を付着、吸着又は含浸させてもよい。このように構成した場合、移植材料の骨修復活性をさらに高めることができる。

請求の範囲

1. 骨組織の代替として生体内に埋植するための非生体活性な人工材料に、骨芽細胞及び前駆骨芽細胞から選ばれる少なくとも1種の細胞を付着させるとともに、付着した細胞が産生する骨マトリックスをコーティングさせた移植材料。

2. 前記人工材料を、チタン、チタン合金、ステンレス鋼、コバルトクロム合金、コバルトクロム-モリブデン合金、アルミナセラミックス、カーボンセラミックス、ジルコニアセラミックス、炭化珪素セラミックス、窒化ケイ素セラミックス、ガラスセラミックス、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリウレタン、ポリビニルアルコール、ポリプロピレン、ポリカーボネート、ポリメタクリル酸メチル、メタクリル酸エステル系ポリマー、シリコーン樹脂及び生体吸収性高分子から選ばれる少なくとも1種の材料から構成した請求項1に記載の移植材料。

3. 前記人工材料の表面に生体活性な基質を被覆した請求項1又は請求項2に記載の移植材料。

4. 前記生体活性な基質は、ヒドロキシアパタイト、リン酸三カルシウム、カルシウム欠損型アパタイト、非晶質リン酸カルシウム、リン酸四カルシウム、リン酸八カルシウム、フッ素アパタイト、炭酸アパタイト、ピロリン酸カルシウム、ブルッシャイト、モネタイト、炭酸カルシウム、アパタイト含有結晶化ガラス、メタリン酸カルシウム含有結晶化ガラス及びバイオガラスから選ばれる少なくとも1種である請求項3に記載の移植材料。

5. 前記人工材料は、チタン、チタン合金、ステンレス鋼、コバルトクロム合金及びコバルトクロム-モリブデン合金から選ばれる少なくとも1種の金属材料

料からなる請求項 1 乃至 4 のいずれか一項に記載の移植材料。

6. 前記人工材料は、アルミナセラミックス、カーボンセラミックス、ジルコニアセラミックス、炭化珪素セラミックス、窒化ケイ素セラミックス及びガラスセラミックスから選ばれる少なくとも 1 種のセラミックス材料からなる請求項 1 乃至 4 のいずれか一項に記載の移植材料。

7. 前記人工材料は、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリウレタン、ポリビニルアルコール、ポリプロピレン、ポリカーボネート、ポリメタクリル酸メチル、メタクリル酸エステル系ポリマー、シリコーン樹脂及び生体吸収性高分子から選ばれる少なくとも 1 種の合成樹脂材料からなる請求項 1 乃至 4 のいずれか一項に記載の移植材料。

8. 前記骨マトリックスは、骨髄細胞、間葉系幹細胞、骨芽細胞及び前駆骨芽細胞から選ばれる少なくとも 1 種の細胞が分泌する成長因子を含む請求項 1 乃至 7 のいずれか一項に記載の移植材料。

9. 前記人工材料の表面が多孔質状に形成されている請求項 1 乃至 8 のいずれか一項に記載の移植材料。

10. 前記骨マトリックスの少なくとも一部が石灰化されている請求項 1 乃至 9 のいずれか一項に記載の移植材料。

11. 前記骨芽細胞又は前駆骨芽細胞は、前記生体由来の間葉系幹細胞を培養して分化させたものである請求項 1 乃至 10 のいずれか一項に記載の移植材料。

12. 骨組織の代替として生体内に埋植するための移植材料を製造するための方

法において、

生体から採取した間葉系幹細胞を培養して骨芽細胞及び前駆骨芽細胞から選ばれる少なくとも1種の細胞に分化させる工程と、

前記分化させた細胞を非生体活性な人工材料とともに培養する工程とを含み、

それにより、前記分化させた細胞が人工材料の表面に付着されるとともに、前記分化された細胞が産生する骨マトリックスが人工材料の表面にコーティングされる方法。

13. 前記方法が分化させた細胞を継代培養して細胞数を増やす工程を更に含む請求項12に記載の方法。

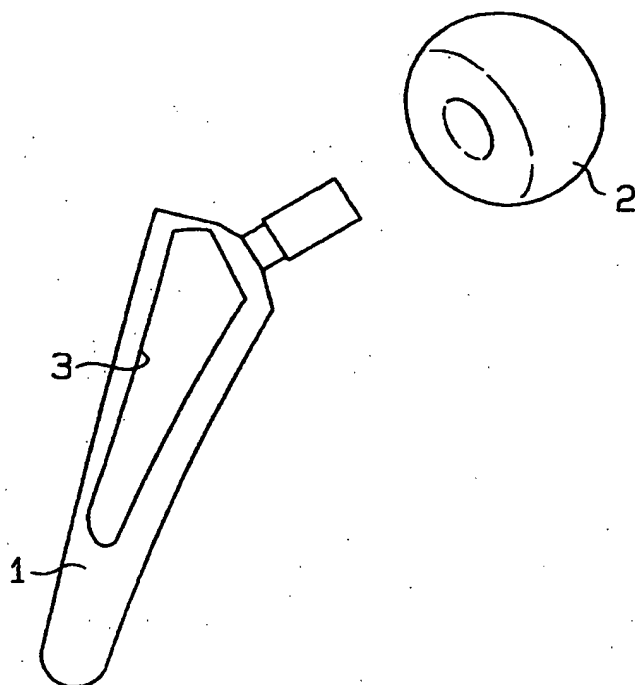
14. 骨組織の代替として生体内に埋植するための移植材料を製造するための方法において、

生体から採取した間葉系幹細胞を非生体活性な人工材料とともに培養する工程と、

前記間葉系幹細胞を人工材料の表面に付着させるとともに、表面に付着された間葉系幹細胞を骨芽細胞及び前駆骨芽細胞から選ばれる少なくとも1種の細胞に分化させる工程とを含み、

それにより前記分化された細胞が産生する骨マトリックスが人工材料の表面にコーティングされる方法。

図1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/07892

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61L 27/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61L 27/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
 Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2000
 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2000 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2000

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 CA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO, 93/25246, A1 (Stryker Corporation), 23 December, 1993 (23.12.93), Full text & AU, 9345997, A & US, 5344654, A & EP, 646022, A1 & JP, 7-504680, W & CA, 2138270, C	1-5, 8-9, 11-14
Y	JP, 7-116184, A (Terumo Corporation), 09 May, 1995 (09.05.95), Par. No. [0008] (Family: none)	6-7
Y	WO, 97/40137, A1 (Osiris Therapeutics, Inc.), 30 October, 1997 (30.10.97), Full text & AU, 9724622, A & EP, 906415, A1 & JP, 13-508911, W	1-9, 11-14
Y	JP, 8-112341, A (THE JAPAN STEEL WORKS, LTD.), 07 May, 1996 (07.05.96), Full text (Family: none)	1-14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report
 27 February, 2001 (27.02.01)

Name and mailing address of the ISA/
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/07892

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, 97/05238, A1 (University College London), 13 February, 1997 (13.02.97), page 1, lines 22 to 25; page 9, line 22 to page 10, line 12 & AU, 966229, A & EP, 842265, A1 & JP, 11-510690, W	1-14

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO0/07892

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ A61L 27/00		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ A61L 27/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2000年 日本国登録実用新案公報 1994-2000年 日本国実用新案登録公報 1996-2000年		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
CA (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	W0,93/25246, A1 (ストライカー コーポレーション) 23. 12月. 1993 (23. 12. 93) 全文, AU, 9345997, A & US, 5344654, A & EP, 646022, A1 & JP, 7-504680, W & CA, 2138270, C	1-5, 8-9, 11-14
Y	JP, 7-116184, A (テルモ株式会社) 09. 5月. 1995 (09. 05. 95) 段落番号【0008】 (ファミリーなし)	6-7
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		
の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	24. 02. 2001	国際調査報告の発送日
		27. 02. 01
国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官 (権限のある職員)	4 C 9261
日本国特許庁 (ISA/J P)	八原 由美子	
郵便番号 100-8915		
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	電話番号 03-3581-1101 内線 3451	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO, 97/40137, A1 (オシリス セラピューティクス, インコーポレーティッド) 30. 10月. 1997 (30. 10. 97), 全文, & AU, 9724622, A & EP, 906415, A1 & JP, 13-508911, W	1-9, 11-14
Y	JP, 8-112341, A (株式会社日本製鋼所) 07. 5月. 1996 (07. 05. 96), 全文, ファミリーなし	1-14
A	WO, 97/05238, A1 (ユニバーシティ カレッジ ロンドン) 13. 2月. 1997 (13. 02. 97), 第1頁第22行~25行, 第9頁第22行~第10頁第12行 & AU, 966229, A & EP, 842265, A1 & JP, 11-510690, W	1-14